

⑫ 公開特許公報(A) 平3-28752

⑤ Int.Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成3年(1991)2月6日

G 01 N 27/327

7363-2G
7363-2G

G 01 N 27/30

3 5 3 B
J

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全6頁)

⑭ 発明の名称 酵素固定化電極およびその製造方法

⑰ 特 願 平1-164797

⑱ 出 願 平1(1989)6月27日

⑲ 発 明 者 尾 持 輝 行 大阪府門真市大字門真1048番地 松下電工株式会社内
 ⑲ 発 明 者 宮 脇 明 宣 大阪府門真市大字門真1048番地 松下電工株式会社内
 ⑲ 出 願 人 松下電工株式会社 大阪府門真市大字門真1048番地
 ⑲ 代 理 人 弁理士 松本 武彦

明 細 書

1. 発明の名称

酵素固定化電極およびその製造方法

2. 特許請求の範囲

1 導電性材料からなる電極本体に酵素固定化膜および妨害物質除去膜が設けられている酵素固定化電極において、前記妨害物質除去膜が保湿剤を含んでいることを特徴とする酵素固定化電極。

2 導電性材料からなる電極本体表面上に形成された妨害物質除去膜の上に酵素固定化膜を形成する酵素固定化電極の製造方法において、前記妨害物質除去膜に保湿剤を含めておくことを特徴とする酵素固定化電極の製造方法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

この発明は、グルコース等の基質検出用の電極などとして用いられる酵素固定化電極(「酵素電極」とも言う)およびその製造方法に関する。

(従来技術)

酵素を白金等の電極本体(または電極素材。以

下同様)表面上に固定化した酵素固定化電極として、ゼラチンおよび架橋剤としてのグルタルアルデヒドを含む希薄な酵素溶液を白金電極に塗布し、電極本体表面上で製膜を行うとともに、酵素を共有結合的に固定化して電極本体表面上に酵素固定化膜を形成したものがあつた。ここで、ゼラチンは、酵素固定化膜のマトリックス成分となるものであつて、希薄な酵素溶液と架橋剤としてのグルタルアルデヒドだけでは架橋反応により得られる酵素固定化膜の強度が弱いので、膜強度を高めるために使用される。たとえば、グルコースオキシダーゼの固定化膜では、酵素に対して5〜10倍程度のゼラチンを加えてグルタルアルデヒドで架橋させて製膜するようにしている。

このような酵素固定化電極を用いるに際しては、試料溶液中における被測定物質以外の多種多様の成分の妨害から酵素固定化電極を保護する必要がある。そのため、電極本体表面と酵素固定化膜の間などに妨害物質を除去する妨害物質除去膜(以下「妨害除去膜」と言う)を形成した妨害不感

型酵素固定化電極が提案されている。

たとえば、特開昭62-88953号公報では、電極本体表面にグルコースオキシダーゼの固定化膜を設けたものを、ピロールおよびNaClを含む電解重合液中に浸して電解重合処理を行い、前記固定化膜の上に電解重合膜を備えた酵素固定化電極が記載されている。同電解重合膜が妨害除去膜である。また、特開昭63-304150号公報では、電極本体表面に内側膜、中間膜および外側膜をこの順に設けた酵素固定化電極が記載されている。中間膜は、グルコースオキシダーゼの固定膜である。外側膜は、ポリカーボネートフィルムであり、未希釈の血液または血清中のグルコース分子に比べて高分子物質の除去を行う。内側膜は、酢酸セルロースからなる膜であり、ポリカーボネートフィルムで除去されなかった妨害物質（たとえば、アスコルビン酸および尿酸）を除去する。

〔発明が解決しようとする課題〕

電極本体表面上で製膜された妨害除去膜を備え

た妨害不感型酵素固定化電極では、妨害除去膜が乾燥に弱いため、湿度の変化により膜の収縮が生じ、水溶液中での測定および乾燥を繰り返せば、電極本体表面から妨害除去膜および酵素固定化膜が剥離し、検出感度が低下するなどして使用できなくなるという欠点がある。

また、第3図(向)にみるように、酵素を固定化していない妨害除去膜5は、湿度が低すぎると、電極本体1より剥離するため、酵素の固定化作業をたとえば湿度80%以上の調湿器内で行わなければならない。

この発明は、このような事情に鑑みてなされたものであって、電極本体からの妨害除去膜の剥離が生じにくく、出力感度の初期変動の小さい酵素固定化電極を提供することを第1の課題とする。さらに、この発明は、妨害除去膜の上に酵素固定化膜を形成する場合に、雰囲気調湿を行わなくてもよい酵素固定化電極の製造方法を提供することを第2の課題とする。

〔課題を解決するための手段〕

3

発明者らは、妨害除去膜の電極本体からの剥離を防いだり、雰囲気調湿を行わずに妨害除去膜の上に酵素固定化膜を形成したりするための手段を検討した。その結果、妨害除去膜自体に保湿性を持たせればよいことを見出し、この発明を完成させた。

したがって、上記第1の課題を解決するために、この発明にかかる酵素固定化電極は、導電性材料からなる電極本体に酵素固定化膜および妨害除去膜が設けられているものにおいて、前記妨害除去膜が保湿剤を含んでいることを特徴とする。

上記第2の課題を解決するために、この発明にかかる酵素固定化電極の製造方法は、導電性材料からなる電極本体表面上に形成された妨害除去膜の上に酵素固定化膜を形成するにあたり、前記妨害除去膜に保湿剤を含めておくことを特徴とする。

この発明の酵素固定化電極は、電極本体表面上に少なくとも妨害除去膜および酵素固定化膜を備えている。好ましくは、電極本体表面上に下地膜

4

、妨害除去膜および酵素固定化膜の3層を少なくとも備えている。

ここで、下地膜は、妨害除去膜の電極本体への密着性を良くするために必要に応じて用いられる。下地膜は、たとえば、ゼラチン水溶液などの生体高分子水溶液に架橋剤を添加したものを電極本体表面に塗布し、架橋反応を行って形成された膜である。下地膜のマトリックス成分はゼラチンに限定されない。架橋剤としては、たとえばグルクルアルデヒド等のジアルデヒドが用いられる。

妨害除去膜は、マトリックス成分の少なくとも一部が保湿剤であり、たとえば、アルブミン等のタンパク、ポリアリルアミン等の水溶性高分子、保湿剤および架橋剤を含む溶液を電極本体または前記下地膜または酵素固定化膜上に所定量を塗布し、架橋反応を行わせて、電極表面上で製膜を行う。保湿剤としては、妨害除去膜の水分を保ったりあるいは高めたりするものであれば特に限定はないが、コラーゲン、ポリエチレングリコールアルキル化合物などの界面活性剤、ポリビニルピロ

5

6

リドンやポリビニルアルコールなどの水溶性高分子があるが、妨害除去膜の保湿性を保ち、かつ、妨害除去効果の低下が少ないという点からは、コラーゲンを保湿剤として用いるのが好ましい。コラーゲンとしては、酸処理コラーゲン、アルカリ処理コラーゲン、酵素可溶性コラーゲンなどのいずれも使用可能であり、コラーゲンのタイプも特に限定はない。妨害除去膜を作製するための溶液（以下「妨害除去膜作製液」と言う）では、コラーゲンの濃度は、特に限定されないが、0.01～0.1重量%の範囲が好ましい。0.1重量%を越えると、膜の透過性が悪くなり、応答速度が悪くなる。この発明にかかる酵素固定化電極の応答性は、たとえば20～30秒である。また、妨害除去膜の架橋の程度によって除去される物質の種類を適宜変えることも可能である。妨害除去膜のマトリックス成分としては、保湿剤を含むのであれば、上記のものに限定されない。架橋剤としては、たとえばグルタルアルデヒド等のジアルデヒドが用いられる。

7

安定した測定を行うことができる。

また、妨害除去膜作製用の水溶液の塗布性も良くなり、電極表面上に膜厚が均一になるように製膜することができる。

保湿剤を含まない従来の妨害除去膜では、電極本体に妨害除去膜作製液を塗布後、調湿器の外、たとえば、湿度40～60%程度の雰囲気下に5～10分間放置すると、第3図(a)にみるように、妨害除去膜5が電極本体1から剝離してしまう。このため、調湿器内で湿度80%の雰囲気下に保って第3図(a)にみるように妨害除去膜4を作製する必要があった。これに対し、この発明にかかる酵素固定化電極の製造方法では、妨害除去膜の上に酵素固定化膜を形成するにあたり、あらかじめ前記妨害除去膜に保湿剤を含ませておくので、調湿器の外、たとえば、湿度40～60%程度の雰囲気下に5～10分間放置しても、第3図(a)にみるように妨害除去膜4が形成され、剝離が生じにくい。第1～3図中、3は、セラミック、合成樹脂等からなる絶縁性基板である。電極本体1は、

酵素固定化膜は、グルコースオキシダーゼおよびコレステロールオキシダーゼ等の酵素、ゼラチン等の生体高分子、および、架橋剤を含む溶液（たとえば、水溶液）を電極本体上または妨害除去膜上に所定量塗布し、架橋反応を行わせて製膜を行うとともに固定化して作られる。酵素は、1種類のみを用いるようにしてもよいし、失活などの悪影響が生じないのであれば、2種類以上を用いるようにしてもよい。酵素固定化膜のマトリックス成分としては、酵素の働きを損なわないのであれば、上記のものに限定されない。架橋剤としては、たとえばグルタルアルデヒド等のジアルデヒドが用いられる。

このようにして得られるこの発明にかかる酵素固定化電極は、保湿剤によって妨害除去膜の水分が保たれるため、保湿性を保つことができ、乾燥による妨害除去膜の電極本体からの剝離を防ぐことができる。また、測定溶液中での膨潤率、乾燥させたときの収縮率が小さくなり、酵素固定化電極として使用したときの感度のバラツキがなく、

8

たとえば、この基板3の上に形成されているが、このようなものに限定されない。

なお、この発明にかかる酵素固定化電極は、1000回以上の連続測定も可能である。

〔作用〕

妨害除去膜が保湿剤を含んでいることにより、乾燥・湿潤による収縮・膨潤の変化が小さくなり、剝離しにくくなる。

また、妨害除去膜が保湿剤を含んでいることにより、同妨害除去膜の上に酵素固定化膜を形成するときの雰囲気の調湿を行わずにすみ、妨害除去膜が電極本体から剝離するのが防がれるという利点も得られる。

〔実施例〕

以下に、この発明の具体的な実施例および比較例を示すが、この発明は下記実施例に限定されない。

—実施例1～5および比較例—

第1表にみるような組成の下地膜作製溶液、妨害除去膜作製液および酵素固定化溶液を用いた。

9

10

妨害除去膜のマトリックス成分としてポリアリルアミンおよびアルブミンを、架橋剤としてグルタルアルデヒドを、保湿剤としてコラーゲンをそれぞれ用いた。酵素固定化膜のマトリックス成分は、ゼラチン、ポリアリルアミン、アルブミンであり、架橋剤はグルタルアルデヒドである。下地膜作製液を第1図にみるように、リード部2を有し、基板3上に設けられた電極本体（白金電極）1表面上に所定量塗布したのち架橋反応を行わせて下地膜を製膜した。この下地膜の表面に第1表に示す組成の妨害除去膜作製液6を塗布して（第2図参照）架橋反応を行わせ、妨害除去膜4を形成した（第3図(b)参照）。この妨害除去膜4の表面に第1表に示す組成の酵素固定化溶液を塗布して架橋反応を行わせ、酵素固定化膜を形成した。

なお、比較例では、妨害除去膜作製液を第2図にみるように塗布してから湿度40～60%の雰囲気下に5～10分間放置したところ、第3図(a)にみるように、妨害除去膜5が電極本体1から剥離してしまった。このため、妨害除去膜作製液を

塗布して調湿器内に入れ、湿度80%以上の雰囲気下で妨害除去膜の作製（第3図(b)参照）および酵素固定化膜の作製を行った。

上記実施例および比較例で用いたポリアリルアミンは平均分子量約60000であり、実施例で用いたコラーゲンは高研製の牛真皮・可溶性タイプIコラーゲン溶液（pH3.0、濃度0.3%）のものであった。

実施例1～5および比較例の各酵素固定化電極について検出感度（測定感度）、保湿性および感度変動を調べて結果を第1表に示した。感度は、酵素固定化電極をポーラロアナライザ等の測定装置に接続し、電圧0.6V（対Ag電極）、サンプル量を20μlとして測定した。サンプルは、150mg/dlのグルコース溶液、100mg/dlのコレステロール溶液、妨害物質として、アスコルビン酸（濃度20mg/dl）、血液の凝固防止などに使用されるNaF（濃度50mg/dl）を用いた。保湿性は、妨害除去膜作製液を塗布後、湿度40～60%の雰囲気下で5～10分間程度のうちに

11

12

妨害除去膜が剥離しない場合を○、剥離した場合を×で示した。感度変動は、得られた酵素固定化電極を用いて標準液で20回測定したときの1回目の感度の測定値と20回目の感度の測定値との変化を下式により求めて示した。

$$\left[1 - \frac{1 \text{ 回目の感度}}{20 \text{ 回目の感度}} \right] \times 100 = \text{感度変動}$$

13

第 1 表

| | 下地製作薬液の組成 (重量%) | | | | 妨害除去操作薬液の組成 (重量%) | | | | 酵素固定化溶液の組成 (重量%) | | | | | | | | 感度〔nA〕 | | | | 保湿度 | 感度変動 (%) |
|-------|--------------------|-------|------|-----------|----------------------|---------|-------|-----------|---------------------|---------------|---------|-------|------|-----------|-------|---------|---------|-----|-----|------|------|-------------|
| | ポリアリルミン | アルブミン | ゼラチン | グルタルアルデヒド | コラーゲン | ポリアリルミン | アルブミン | グルタルアルデヒド | グルコキナーゼ | コレステロールオキシダーゼ | ポリアリルミン | アルブミン | ゼラチン | グルタルアルデヒド | グルコース | コレステロール | 妨害物質 | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | アスコルビン酸 | NaF | | | | |
| 実施例 1 | — | — | 0.67 | 0.17 | 0.07 | 0.38 | 3.75 | 1.25 | 1.33 | — | — | — | 0.67 | 0.17 | 28 | — | — | 0.3 | 0 | ○ | +0.3 | |
| 比較例 | — | — | 0.67 | 0.17 | — | 0.38 | 3.75 | 1.25 | 1.33 | — | — | — | 0.67 | 0.17 | 28 | — | — | 0.1 | 0.1 | × | +4.0 | |
| 実施例 2 | — | — | 0.67 | 0.17 | 0.10 | 0.50 | 5.00 | 1.67 | 1.33 | — | — | — | 0.67 | 0.17 | 12 | — | — | 0 | 0 | ○ | -0.5 | |
| 実施例 3 | — | — | 0.67 | 0.17 | 0.08 | 0.50 | 5.00 | 1.67 | 1.33 | — | — | — | 0.67 | 0.17 | 18 | — | — | 0 | 0.2 | ○ | +1.2 | |
| 実施例 4 | 1.00 | — | — | 0.30 | 0.07 | 0.38 | 3.75 | 1.25 | — | 5.00 | 1.00 | — | — | 0.30 | — | 15 | 0.1 | 0 | ○ | -0.6 | | |
| 実施例 5 | 0.20 | 0.20 | — | 0.04 | 0.07 | 0.38 | 3.75 | 1.25 | — | 5.00 | 0.20 | 0.20 | — | 0.04 | — | 60 | 0 | 0.6 | ○ | +0.2 | | |

第1表からわかるように、実施例1～3の酵素固定化電極は、いずれもグルコースを感度良く検出することができ、実施例4および5の酵素固定化電極は、いずれもコレステロールを感度良く検出することができた。また、実施例1～5では、妨害物質はほとんどまたは全く検出されなかった。これに対し、比較例の酵素固定化電極では、感度変動が実施例のもの（±2%以内）よりも大きかった（±4～5%）。また、比較例のものは、湿度40～60%RHの雰囲気下では、第3図(a)にみるように、妨害除去膜5が電極本体1から剥離したが、実施例のものでは、同じ条件下で剥離しなかった。

なお、上記実施例では、固定化する酵素として、グルコースオキシダーゼおよびコレステロールオキシダーゼを用いたが、この発明において使用できる酵素はこれらの2者に限定されるものではない。また、測定用の液も血液に限るものではない。

〔発明の効果〕

この発明にかかる酵素固定化電極は、導電性材料からなる電極本体に酵素固定化膜および妨害除去膜が設けられているものにおいて、前記妨害除去膜が保湿剤を含んでいることを特徴とするので、妨害除去膜の剥離がなく、感度の良い、安定した測定を行うことができる。

この発明にかかる酵素固定化電極の製造方法は、導電性材料からなる電極本体表面上に形成された妨害除去膜の上に酵素固定化膜を形成するにあたり、前記妨害除去膜に保湿剤を含めておくことを特徴とするので、妨害除去膜の上に酵素固定化膜を形成するときに、調湿する必要がない。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、実施例および比較例に用いた白金電極の概略を表す斜視図、第2図は、同白金電極に妨害除去膜作製液を塗布した状態を表す概略断面図、第3図(a)は、比較例の酵素固定化電極における妨害除去膜形成後で酵素固定化膜形成前の状態を表す概略断面図、第3図(b)は、実施例の酵素固定化電極における妨害除去膜形成後で酵素固定化

15

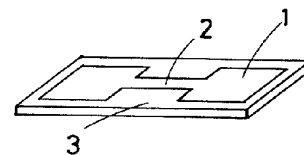
16

膜形成前の状態を表す概略断面図である。

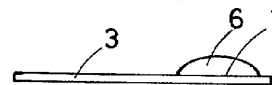
1…電極本体 4…妨害除去膜

代理人 弁理士 松本 武彦

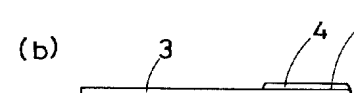
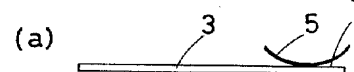
第1図



第2図



第3図



17